

Tagungsbeitrag zu:	Jahrestagung der DBG Kommission III
Titel der Tagung:	Böden - eine endliche Ressource
Veranstalter:	DBG, September 2009, Bonn
Berichte der DBG	(nicht begutachtete online Publikation) http://www.dbges.de/

Molekularbiologische Charakterisierung von Pilzen in Paddy Soils

Rolf Tippkötter¹, Markko Remesch², Thilo
Eickhorst^{1*} und Jan Kuever²

Zusammenfassung

Pilze haben in Reisböden (Paddy Soils) eine große Bedeutung für den Abbau von Reisstroh. Ihre Aktivität und Diversität wird dabei im Wesentlichen durch die sich im Laufe einer Reisanbauphase ändernden Feuchtezustände beeinflusst.

Da durch Verfahren der Kultivierung nur ein geringer Teil der im Boden vorhandenen Pilze erfasst werden kann, wurden molekularbiologische Methoden eingesetzt, um die Pilzgemeinschaften in drei unterschiedlichen Paddy Soils Süd-Ost Chinas zu untersuchen. Mit diesem Ansatz konnten Populationsshifts aufgezeigt werden, die sowohl durch die Austrocknung von Paddy Soils als auch durch unterschiedliche Reisstrohapplikationen hervorgerufen wurden.

Pilze, Reisstroh, Paddy soil, CO₂

1 Einleitung

Pilze sind in vielfältiger Weise an der Transformation von Nährstoffen im Boden beteiligt. Dabei spielen der Abbau organischer Substanz sowie symbiotische Funktionen für Pflanzen eine entscheidende Rolle (Finlay, 2007). In den für den Nassfeldanbau von

Reis genutzten Paddy Soils sind Pilze für den Abbau von Reisstroh von Bedeutung, wobei deren Aktivität stark durch die wechselnden Feuchtezustände beeinflusst wird (Kyuma, 2004). Zum besseren Verständnis der Ökologie von Pilzen in Paddy Soils ist daher die Erfassung ihrer Diversität und funktionalen Vielfalt essentiell. Zu diesem Zweck sind herkömmliche Methoden nur eingeschränkt geeignet, da sie lediglich die leicht kultivierbaren Pilzgemeinschaften erfassen.

Zur Untersuchung der molekularen Ökologie von Prokaryoten kamen in den letzten Jahren verstärkt molekularbiologische Verfahren zum Einsatz, die eine 16S rDNA-basierte phylogenetische Differenzierung ermöglichen (Amann et al., 1995). Diese Verfahren wurden in dieser Arbeit auf die eukaryotischen Pilzgemeinschaften in drei unterschiedlichen Paddy Soils übertragen und zur Untersuchung von Populationsshifts eingesetzt.

2 Material und Methoden

Die molekularbiologische Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Paddy Soils wurde an Bodenproben aus zwei Versuchsansätzen durchgeführt: (1) Ein Mikrokosmenexperiment zur Simulation des Übergangs von der gefluteten zur drainierten Phase des Reisanbaus (Knauth et al., 2009). (2) Ein Inkubationsversuch zum Vergleich verschiedener Reisstrohapplikationen in Reisböden (Eickhorst et al., 2009). Dabei kamen unterschiedliche Böden aus Süd-Ost China zum Einsatz (Tab. 1). Darüber hinaus wurden ausgewählte Pilze eingesetzt, die aus diesen Versuchen isoliert werden konnten.

Die DNA-Extraktion aus Bodenproben erfolgte mit Hilfe des FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals). Durch PCR wurden Bereiche der 18S rDNA amplifiziert (Primerkombination NS1f/FR1; Pennanen et al., 2001). Mit den PCR-Produkten wurden DGGE-Analysen durchgeführt (10-45 % denaturierender Gradient, 58°C, 180 V, 17 h). Die Auswertung der Gele erfolgte über die Distanzmatrix und eine anschließende

¹ Institut für Bodenkunde, Universität Bremen
Leobener Str. - UFT, 28359 Bremen

² Amtliche Materialprüfungsanstalt Bremen
Paul-Feller-Str. 1, 28199 Bremen

* eickh@uni-bremen.de

Tab. 1: Ausgewählte Reisböden.

Bezeichnung	T [%]	U [%]	S [%]	Bodenart (KA5)	Bodentyp (WRB)
LC	13	26	61	SI4	Hydragric Anthrosol
MC	23	44	33	Ls2	Anthraquic Cambisol
HC	41	58	1	Tu3	Stagnic Anthrosol

Neighbor-joining-Analyse zur Erstellung von Dendrogrammen (Hampel et al., 2001). Dominante Banden der DGGE-Gele wurden ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert (Agowa, Berlin). Mit den Sequenzen wurde ein Multiples Alignment generiert (ClustalW), aus dem ein Phylogramm berechnet wurde (Tamura et al., 2007).

3 Ergebnisse

Die DNA-Ausbeute variierte bei den untersuchten Böden entsprechend ihrer Tongehalte (LC>MC>>HC). Aus allen DNA-Extrakten konnten mit der gewählten Primerkombination 18S rDNA-Bereiche amplifiziert werden. Bei der PCR/DGGE-Analyse an den aus Bodenproben gewonnenen Isolaten zeichnete sich im DGGE-Gel jeweils eine dominierende Bande ab.

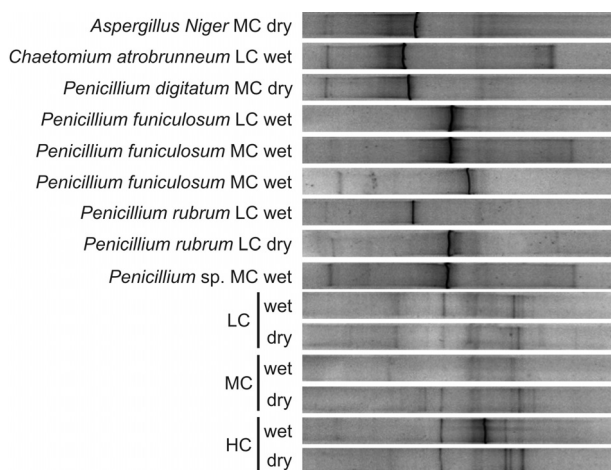


Abb. 1: DGGE-Gel mit ausgewählten Pilzisolaten und DNA-Extrakten aus dem Mikrokosmenexperiment.

Allerdings variierten die Laufverhalten der PCR-Produkte von einheitlich bestimmten Isolaten (z.B. *Penicillium rubrum*), was auf interspezifischen Variationen in den einzelnen Ansätzen zurückzuführen ist (Abb. 1). Die

in der gleichen PCR/DGGE-Analyse gewonnenen Bandenmuster der Bodenproben zeigten keine Übereinstimmungen mit Banden der Pilzisolaten.

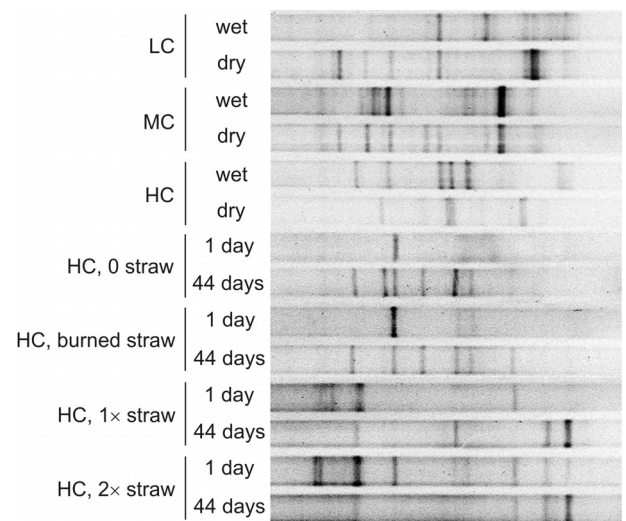


Abb. 2: DGGE-Gel mit Bodenproben aller Versuchsansätze.

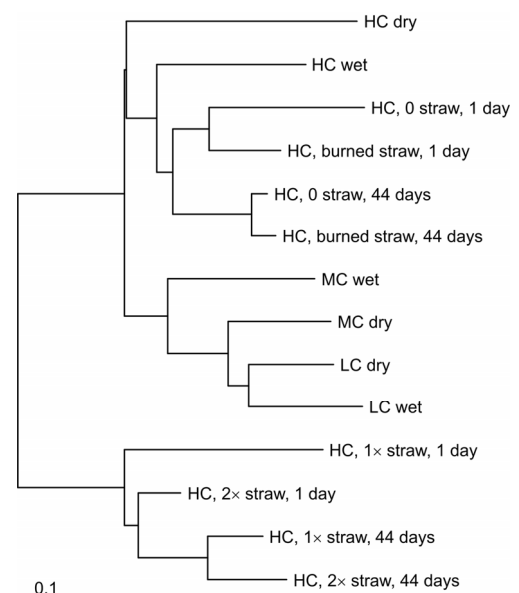


Abb. 3: Dendrogramm der DGGE-Analyse aller Bodenproben (Ähnlichkeits- und Distanzmatrix; Abb. 2).

Durch die PCR/DGGE-Analyse aller Bodenproben aus den beiden Versuchsansätzen (Mikrokosmen und Strohapplikati-

onen) konnten z.T. deutliche Unterschiede zwischen den Feuchtezuständen der Böden als auch der Strohapplikationen ausgemacht werden (Abb. 2). Das entsprechende Dendrogramm weist deutliche Zusammenhänge einzelner Versuchsansätze auf. So bilden die einzelnen Strohapplikationen ein Cluster, das von den übrigen Ansätzen abgegrenzt ist (Abb. 3). Ein weiteres Cluster bilden die Fingerprints der Pilzpopulation der Böden LC und MC, was auf deren gemeinsame Herkunftsregion in China zurückgeführt werden könnte (Eickhorst und Tippkötter, 2009).

Die Sequenzen der DGGE-Banden aller Versuchsansätze wurden im Phylogramm zum größten Teil den Chytridiomycota zugeordnet, wohingegen die aus den unter-

suchten Böden isolierten Pilzspezies ausschließlich unter den Ascomycota gefunden wurden (Abb. 4). Bei den Chytridiomycota handelt es sich um Tüpfchenpilze, die relativ klein sind und bei der Kultivierung nur schwer erfasst werden können. Im Vergleich zu größeren, komplexer aufgebauten Pilzen, ist die DNA-Extraktion bei den Chytridiomycota vermutlich weniger problematisch, weshalb diese Abteilung unter den sequenzierten Pilzen dominiert.

Neben Pilz-Sequenzen repräsentierten einige Banden auch Protisten-Sequenzen (Ciliaten). Dazu zählt auch eine Spezies der Cercozoa, die im Phylogramm exemplarisch als Außengruppe aufgenommen wurde.

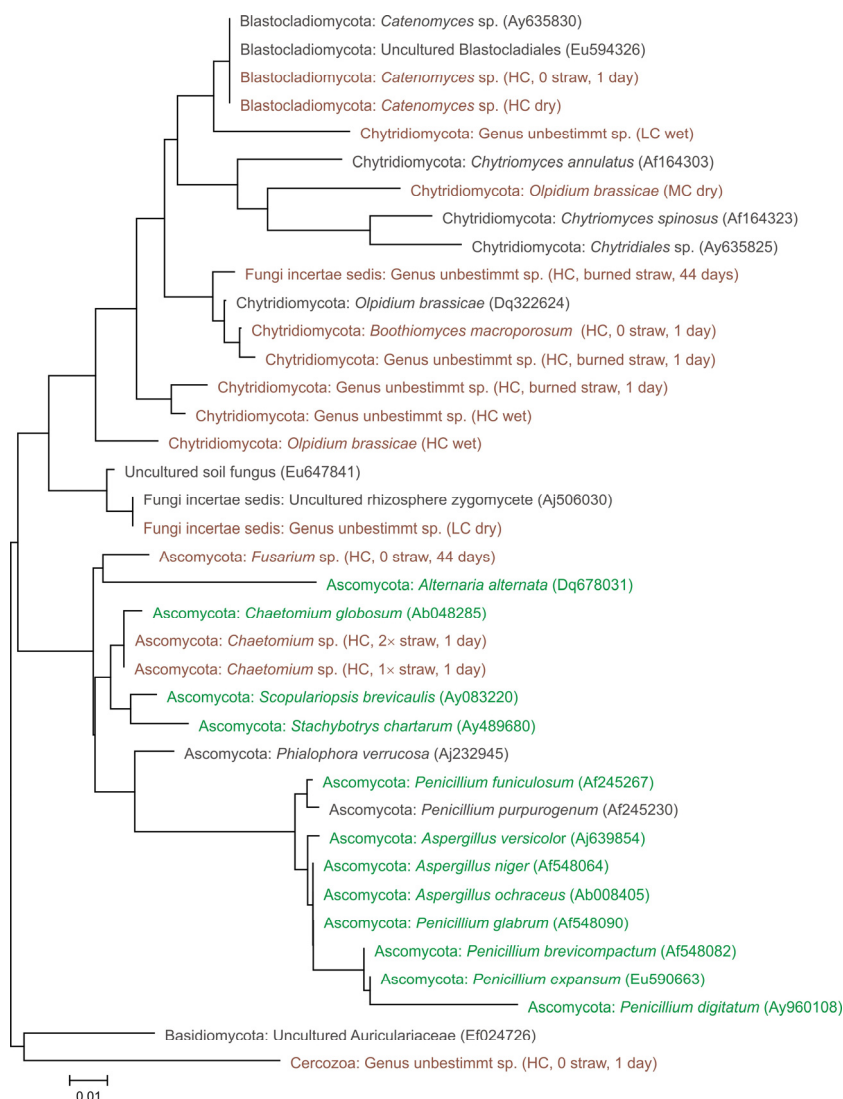


Abb. 4: Phylogramm der sequenzierten Banden (rot) und Vergleichssequenzen der durch Anreicherung bestimmten Pilzspezies (grün). Respirationskurven im Inkubationsversuch.

4 Schlussfolgerungen

Die PCR/DGGE-Analyse von Pilzen aus Bodenproben zeigte deutliche Zusammenhänge zwischen ähnlichen Varianten und Böden aber auch Unterschiede im Vergleich zu den kultivierungsabhängigen Ansätzen. Schwierigkeiten bereitete die Auflösungstiefe phylogenetischer Einheiten bei der Untersuchung pilzlicher 18S rDNA. Diese könnte durch die Betrachtung der ITS1- und ITS2-Bereiche (internal transcribed spacer region) verbessert werden, was allerdings bei der Auswahl von Oligonukleotidsonden für die Anwendung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung Probleme mit sich bringen dürfte.

Literatur

Amann, R., Ludwig, W. und Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59, 143-169.

Eickhorst, T., Rabenstein, A., Rudolph, C., Kuever, J. und Tippkötter, R. (2009). Abbau von Reisstroh durch Pilzgemeinschaften aus Paddy Soils. *Berichte der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* (<http://eprints.dbges.de>).

Eickhorst, T. und Tippkötter, R. (2009). Management-induced structural dynamics in paddy soils of South East China simulated in microcosms. *Soil and Tillage Research* 102, 168-178.

Finlay, R. D. (2007). The Fungi in Soil. In: van Elsas, J.D., Jansson, J.K. und Trevors, J.T. (Hrsg.). *Modern Soil Microbiology*. 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, USA, S. 107-146.

Hampl, V., Pavlicek, A. und Flegr, J. (2001). Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 731-735.

Knauth, S., Eickhorst, T. und Tippkötter, R. (2009). Bewirtschaftungsinduzierte Populationsveränderungen von Archaeen in Paddy Soils. *Berichte der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* (<http://eprints.dbges.de>).

Kyuma, K. (2004). *Paddy Soil Science*. Kyoto University Press, Kyoto, Japan.

Pennanen, T., Paavolainen, L. und Hantula, J. (2001). Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 697-699.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. und Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.